

母乳中の抗 Respiratory Syncytial Virus 活性に関する研究

本 庄 高 司

札幌医科大学小児科学講座 (主任 千葉峻三 教授)

The Study on Anti-Respiratory Syncytial Virus Activity in Breast-Milk

Takashi HONJO

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College
(Chief : Prof. S. Chiba)

ABSTRACT In order to investigate the role of the breast-feeding process for inducing resistance against respiratory syncytial virus (RSV) infection in infants, specimens of colostrum and breast milk were examined for the presence of RSV-specific antibody in three immunoglobulin classes as well as for the presence of neutralization activity. Little IgM or IgG antibody to RSV was observed with either kind of specimen.

RSV-specific IgA antibody was detected in 40 (7%) out of 547 colostrum specimens, with the highest incidence (15%) being observed with specimens examined from May to June. However, in most of the specimens, IgA antibody titer declined to lower levels during subsequent months. On the other hand, RSV neutralization activity was detected in most of the colostrum and breast milk specimens of up to 7 months of lactation, without significant decrease of the activity. Among mothers of 24 infants with RSV infection, five mothers were simultaneously infected with this virus and two of them developed the IgA antibody in breast milk 2 weeks after the onset of illness. Analysis by radioimmunoprecipitation of milk antibody demonstrated that antigenic specificity of the IgA antibody was directed to major RSV structural components including fusion protein and attachment G protein.

These observations seem to suggest that RSV-specific IgA antibody in breast milk, in conjunction with a nonspecific neutralization substance, could exert its protective effects through reinforcing the still immature local immune mechanisms, in young infants.

(Received July 8, 1989 and accepted August 4, 1989)

Key words: Respiratory syncytial virus(RSV), Breast-feeding, RSV-specific IgA antibody, Neutralization activity, Radioimmunoprecipitation

1 緒 言

Respiratory syncytial virus (RSV) は小児下気道感染症の主要な起因ウイルスであり、特に、生後半年未満の乳児において、肺炎、細気管支炎など重篤な下気道疾患を発症させる^{1,2)}。また、基礎疾患、特に先天性心疾患を有する小児ではしばしば致死経過をたどることも知られている^{3,4)}。現在のところ RSV 感染の免

疫的予防法の確立、即ち RSV ワクチンの実用化には至っていないが、依然としてその開発研究は続けられており^{5,6)}、これと密接に関係して、本症の感染免疫機構の解明は未だ重要な課題である。

乳幼児 RSV 感染の免疫機序を考える上で重要な点の一つとして母乳栄養の問題がある。即ち、臨床的および疫学的観察から、母乳栄養児では人工栄養児に比して重症 RSV 感染の少ないことが指摘され⁷⁻⁹⁾、その機

序についていくつかの検討がなされてきた。これらにおいては初乳および乳汁中の RSV 中和活性あるいは特異的 IgA 抗体の測定等が主なものである^{7,10,11)}。また、このような母乳中への抗ウイルス活性の出現には母体の RSV 罹患が密接に関係していることが推測されてきたが、それら両者間の時期的関係およびウイルス特異性などについては未だ充分明らかにされていない。これらのことから、著者は間接蛍光抗体法およびウイルス中和試験により、母乳抗 RSV 活性の分娩後の推移、母親の RSV 感染に伴うその変動を多数例につき調べ、さらに免疫沈降法(Radioimmunoprecipitation, RIP)でその抗体の RSV 蛋白特異性につき検討を加えた。

2 研 究 対 象

2.1 正常母体からの母乳検体

昭和 59 年 6 月より昭和 62 年 6 月まで札幌第一病院において分娩した母親より母乳を採取した。採取時期別では分娩後 2~7 日(初乳)547 検体、分娩後 1 カ月 58 検体であり、分娩後 3~7 カ月では 56 検体を検索対象とした。なお、初乳検体の得られた 547 例中 42 例の母親からは、分娩後 1 カ月に再度母乳を採取することができた。これらの検体は 3,000 rpm, 30 分間遠心し、中間層を乳汁上清とし、使用まで -20℃ に凍結保存した。

2.2 RSV 罹患児の母親からの検体

昭和 60 年 1 月より昭和 63 年 4 月までに札幌第一病院および札幌医大を受診し、ウイルス分離により RSV 感染の診断をうけた母乳栄養児 24 名(年齢:生後 16 日~2 歳 4 カ月, 平均 5.4 カ月)の母親から継続的に母乳を採取し、また、その母親 16 名につき RSV 分離を試みた。同時に 24 例中 14 名の母親については約 2 週間隔で血液を採取し、後の血清学的検索に供した。

3 研 究 方 法

3.1 ウイルス分離および同定

気道症状を呈して受診した患児およびその母親から採取した鼻咽頭 swab を 0.5% 牛胎児血清(FCS)加 Eagle MEM 培養液(以下 MEM 液と略す)2 ml の入った容器中で攪拌し、3,500 rpm, 15 分間遠心後、上清 0.2 ml をチューブ培養した HEp-2 細胞に接種した。1 時間吸着後、0.5%FCS 加 MEM 液を 1.5 ml 加え、継続的に細胞変性効果(cytopathogenic effect; CPE)の出現を観察した。本ウイルスに特有な合胞細胞の出現が認められた場合を RSV 陽性としたが、必要に応じ、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗

RSV 抗体(デンカ生研, 東京)を用いた蛍光抗体直接法による同定も併用した。

3.2 蛍光抗体間接法による母乳中 RSV 特異的 IgA・IgG・IgM 抗体価の測定

母乳中 RSV 特異的抗体価は, Zaia and Oxman¹²⁾の方法に従って測定した。即ち、単層培養した HEp-2 細胞に RSV (Long 株)を感染させ、軽度の CPE が出現した時に、50 N-benzoyl-arginine ethyl ester 単位の acethyltrypsin-EDTA (0.02%) で 15 分間処理し、剥脱した細胞を PBS で 3 回洗浄後、同液にて 2×10^6 /ml の細胞浮遊液を作成した。次に、これと等量の 0.15% glutaraldehyde を加え、0℃, 1 分間反応させた後、glycine: glutaraldehyde のモル比が 10:1 になるように glycine を加えて固定し、PBS で 3 回遠心洗浄後、上清を除去した。これを 30%FCS および 8% dimethylsulfoxide (DMSO) を含む MEM 液に浮遊させ、 2×10^6 /ml に細胞数を調整して使用まで -80℃ に凍結保存した。この方法により作成した感染細胞の膜抗原陽性率は 30~50% であった。抗体測定に際しては、まず感染細胞 25 μ l (5×10^4) をマイクロプレートの各 well に分注し、PBS により 2 倍階段希釈した母乳を等量加えて、37℃, 40 分間反応させた。その後 PBS にて 3 回遠心洗浄し、それぞれ 10 倍に希釈した FITC 標識抗ヒト IgA・IgG・IgM 抗体 (Dacopatts, Denmark) の 25 μ l を加え、さらに 40 分間反応させて同様に洗浄後、スライドガラスに滴下し、蛍光顕微鏡下にて膜抗原陽性細胞の存在を観察した。

なお抗体測定に際しては、同様の固定処理をおこなった非感染細胞を陰性対照として、また人プール血清で反応させた RSV 感染細胞を陽性対照として常時実験に含めた。検体の膜蛍光抗体価の end point は、陽性対照の 50% 以上の細胞が染色される希釈倍数の逆数で表わした。

3.3 中和活性の測定

母乳検体を、56℃, 30 分間非動化し、MEM 液で 4 倍階段希釈した。各希釈検体 25 μ l に 100 PFU/0.1 ml に調整したウイルス液を等量加え、ウイルス対照と共に、37℃, 60 分間反応させた。次に、この混合液の 0.1 ml を multiwell plate (Linbro scientific, Inc. Hamden, Conn. USA) に培養した HEp-2 単層細胞の 2 well に接種し、120 分間吸着させた。その後 0.5% FCS 加 MEM 液で作成した 0.75% メチルセルローズ液 1 ml を重層し、37℃ 炭酸ガス培養器にて培養した。3 日後に同液 1 ml を追加し、さらに 2~3 日間培養後、ホルマリンおよびクリスタルバイオレットにより固定、

染色後、ブラック数を算定した。

中和活性は対照ブラック数の60%以上を減少させる最高希釈倍数の逆数で表わした。

3.4 免疫沈降法による母乳 IgA 抗体の RSV 蛋白特異性の分析

3.4.1 RSV の [³⁵S] Methionine および [³H] Glucosamine 標識

まず、RSV Long 株を単層 HEP-2 細胞に m. o. i. 約5の割合で感染させ、炭酸ガス培養器にて維持培養した。 [³H] Glucosamine 標識の場合は感染約15時間後、維持液を [³H] Glucosamine hydrochloride (Amersham, England) を 50 μ Ci/ml の割合で添加した培養液と交換し、CPE が約75%となるまでさらに約15時間培養した。この感染細胞を二度 PBS で洗浄後、ラバーポリスマンを用いて剥離し、再度 PBS にて遠心洗浄した。洗浄後のペレットに溶解 buffer (0.5% Nonidet P-40, 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.15 M NaCl) 0.6 ml を加え、 1×10^5 G にて10分間遠心して不溶性物質を除去した。得られた上清に3倍量の免疫沈降反応用 buffer (1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.15 M NaCl) を加え、使用まで -70°C に保存した。

[³⁵S] Methionine 標識の場合は、CPE が約75%の時点で培養液を Methionine 除去 MEM 液に交換した。さらに3~4時間後、CPE が100%の時点で、 [³H] Glucosamine 標識の場合と同様の方法によりウイルス蛋白液の作成をおこなった。

3.4.2 免疫沈降法

上述した標識ウイルス蛋白液 95 μ l に母乳検体を 5 μ l 加え、4°C で一夜反応させた後、抗ヒト IgA、又は抗ヒト IgG ヤギ IgG (MBL, 名古屋) を 5 μ l ずつ加え、4°C、3時間反応させた。次いで17% protein A-Sepharose CL-4B ビーズ (Pharmacia, Sweden) 懸濁液を 40 μ l 加えて45分間反応させ、下記の3種類の buffer により、順番にそれぞれ一度ずつビーズを洗浄した。即ち、まず1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) を含む 0.15% M 食塩水で洗浄し、次に0.5% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 0.05% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7.8) 加 0.15 M 食塩液、最後に10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.15 M 食塩液で洗浄した。

このビーズに 70 μ l のサンプル buffer (62 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mer-

captoethanol) を加え 100°C、4分間処理後、SDS-polyacrylamide gel により電気泳動をおこなった。gel を固定、染色後フルオログラフィーのための Enhance (New England Nuclear, MA) 処理をおこない、乾燥後、Kodak X-Omat AR5 フィルムと接触させ、-80°C にて蛋白沈降線を得た。

3.5 統計処理

平均値の差の検定は、t-検定によりおこなった。

4 成 績

4.1 母乳中 RSV 特異的抗体価

4.1.1 クラス別特異抗体

3年間にわたり採取された初乳 547 検体のうち、RSV 特異的 IgA 抗体価 (以下 IgA 抗体価と略す) が2倍以上を示したものは40検体 (7.3%)、IgG 抗体価が2倍以上を示したものは2検体 (0.3%) のみであり、IgM 抗体は全て陰性であった。これら IgA 抗体検出率およびその抗体価を、検体採取時期別に Fig. 1 に示した。また、そのうち継続的に採取しえた検体の抗体価の変動も同図に示した。個々の陽性検体についてみると、2倍が5例、4倍が8例、8倍が10例、16倍が10例、32倍が5例、64倍が1例であり、最高値256倍は1例に認められた。次に採取時期別に IgA 抗体陽性率をみると、RSV 感染の流行する12月~2月の陽性率はむしろ低く (2%~6%)、5~6月にかけて陽性率のピーク (15%) が認められた。また、初乳 IgA 抗体陽性の母親から連続して採取された分娩後1カ月目の母乳 34 検体の IgA 抗体価は、初乳と比較して多くの場合急速に低下しており、そのうち12検体において IgA 抗体は検出感度以下であった。しかし、逆に、この間 IgA 抗体価にはほとんど変動のない症例も少数に存在した。

なお他のクラス別抗体の推移では、初乳 IgG 抗体陽性検体2例は共に2倍であり、また、初乳では陰性であった分娩3カ月目の母乳1検体で IgG 抗体が検出され、その抗体価は4倍であった。IgM 抗体は全例検出されなかった。

4.1.2 中和活性

初乳検体の採取後、何らかの時期に再度、母乳の採取が可能であった IgA 抗体陽性の36例、同陰性45例につき初乳 (81 検体)、生後1カ月 (58 検体) および3~7カ月 (56 検体) の母乳の中和活性を測定し、それらの推移を IgA 抗体価との関係で Fig. 2 に示した。

まず初乳では、中和活性は全検体8倍以上の陽性を示し、その幾何平均は $2^{5.2}$ で、IgA 抗体価の幾何平均 $2^{1.5}$ に比し著しい高値であった。また、IgA 抗体価が陰

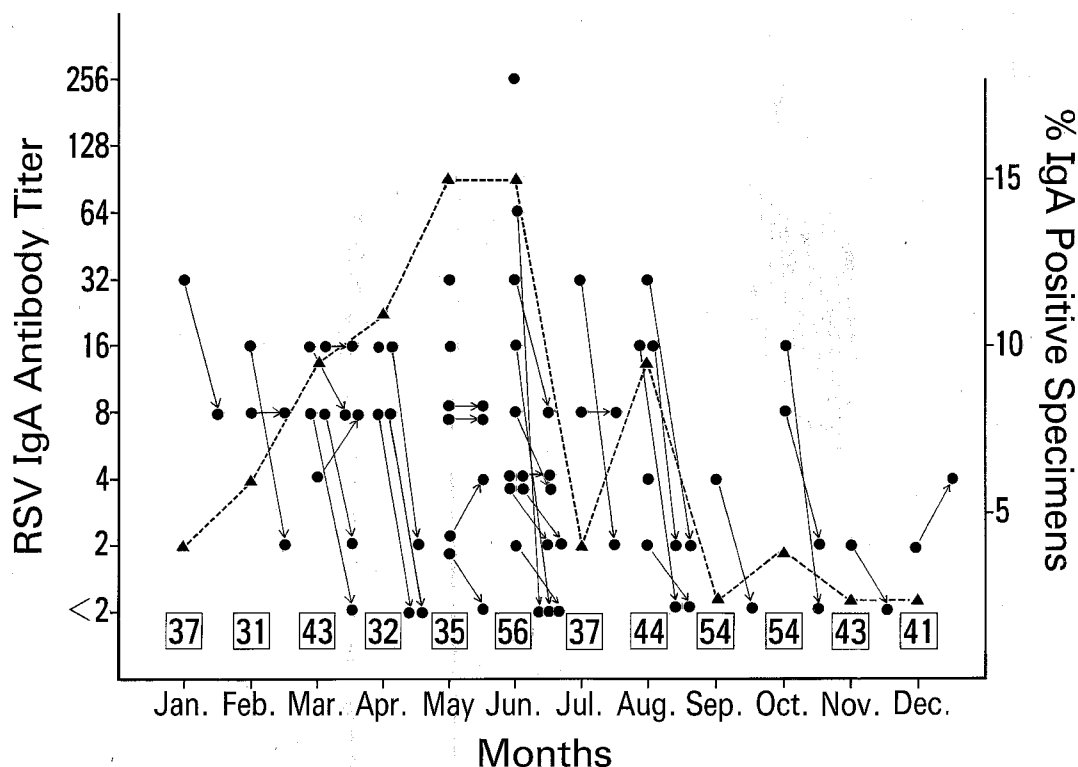


Fig. 1 RSV IgA antibody in colostrum and one month-postpartum milk arranged according to months when specimens were collected. Numerals in the bottom cases indicate number of specimen negative (<2) for RSV IgA antibody. ●, RSV IgA antibody titers in colostrum. →●, RSV IgA antibody titers in milk at 1 month postpartum. ▲, Percentage of colostral specimen positive for RSV IgA antibody.

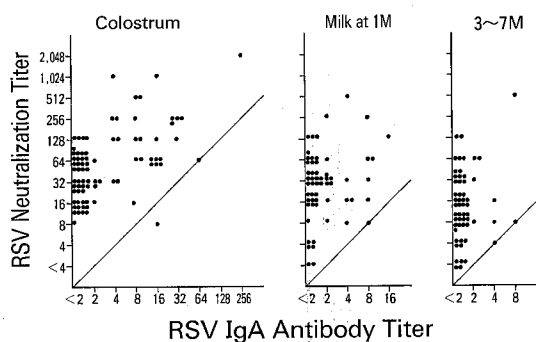


Fig. 2 Sequential changes of RSV neutralization titers in colostrum and milk as compared to those of RSV IgA antibody titers.

性であっても、中和活性は8~128倍と比較的高い値を示した。中和活性とIgA抗体価との間には有意な相関関係($r=0.559$, $p<0.001$)が観察されたが、個々の検体ではこれらの両者間に著しい解離が認められた。

分娩後1カ月および3~7カ月目の中和活性は、初乳のそれに比し幾分低値であり、その幾何平均は前者では $2^{4.6}$ 、3~7カ月目では $2^{3.7}$ であった。また、これらの2群ではIgA抗体価と中和活性の間に有意な相関は認められなかった。これらのことから、初乳、あるいはそれ以後の時期における母乳中にはRSV特異的IgAのみならず、免疫グロブリン以外の中和活性を有する物質が高濃度に存在している可能性が示唆された。

4.2 母体のRSV感染と母乳中抗RSV活性の経時的推移

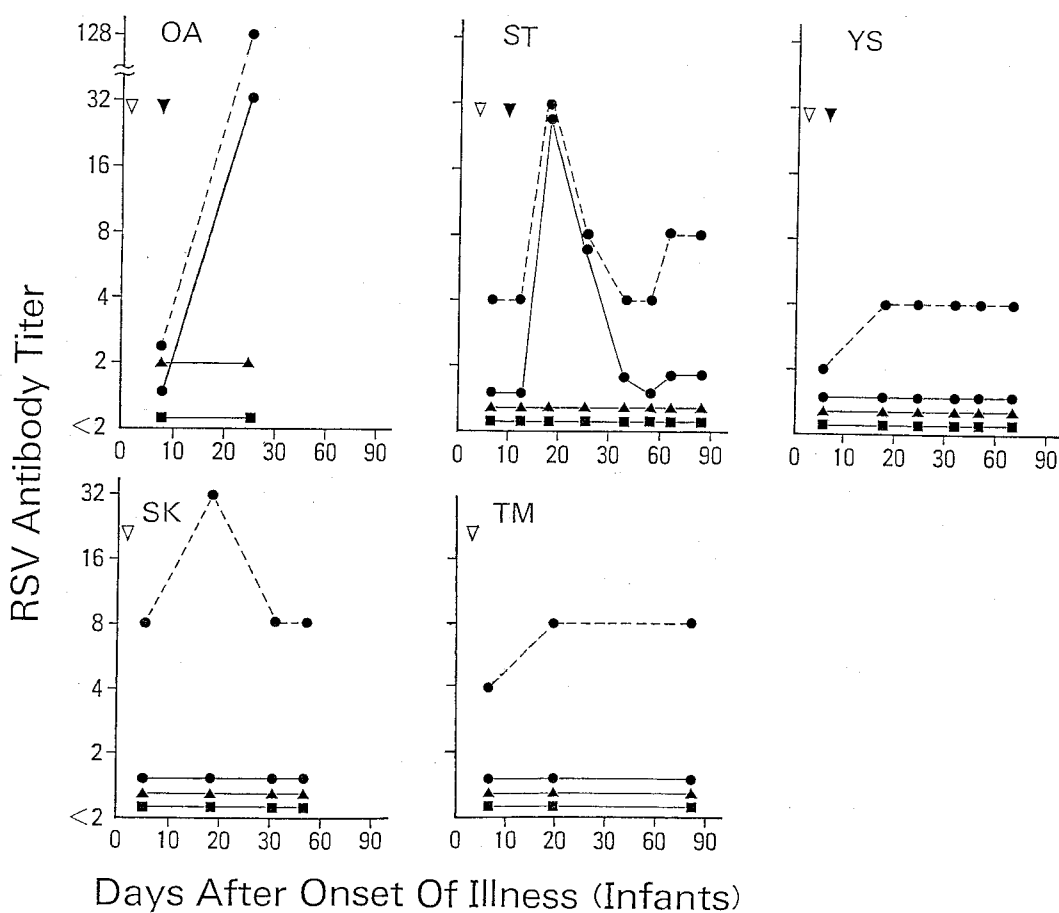
RSV罹患母乳栄養児24名の母親のうち3例でRSVが分離され、また、2例においては、ウイルス分離は陰性であったが血清中和抗体の有意な上昇があったので、合計5例の母親がRSVに罹患したと考えられた。まず、これら5例の乳児の月齢、診断名と母親のウイルス分離および血清学的検討の結果をTable 1に示した。また、RSV感染および非感染母体における母乳抗体の推移を各々Fig. 3およびFig. 4に示した。

RSV感染例のうち、ウイルスが分離された母親3例

Table 1 *profile of 5 pairs of an infant and a mother both infected with RSV*

Infants			Mothers		
Name	Age in months	Clinical diagnosis	RSV recovery	Serum neutralization titer	
				Acute	Convalescence
OA	4M	Bronchitis	+ 8 days ^{a)}	128	512
ST	2M	Bronchiolitis	+ 7 days	16	1024
YS	10M	Bronchiolitis	+ 7 days	64	256
SK	6M	Bronchiolitis	—	128	512
TM	3M	Bronchiolitis	—	512	2048

a) days after onset of infant's RSV illness

**Fig. 3** Response of RSV antibody and neutralization activity in breast milk of mothers with culculture-proven or serologically confirmed RSV infection. ●---●, RSV neutralization titers; ●—●, RSV IgA antibody titers; ▲, RSV IgG antibody titers; ■, RSV IgM antibody titers; ▽, Isolation of RSV from an infant; ▽, Isolation of RSV from a mother.

中2例の母乳において、約2週間後にIgA抗体価の上昇が認められた。即ち、OAでは2倍以下から32倍、STにおいては2倍以下から32倍と明らかな上昇が観察され、それと平行して中和活性もOAで4倍以下から128倍、STで4倍から32倍と上昇した。なお、OAの母乳ではIgG抗体も検出されたが明らかな上昇はなかった。一方、症例YSの母乳ではIgA抗体価は上昇せず、中和活性にも変動は認めなかった。なお、分娩直後採取されていたOAの母親の初乳は、IgA、IgG、IgM抗体価はそれぞれ2倍以下、中和活性は16倍であり、IgA抗体価の上昇は明らかに今回の母親の罹患によって生じたものと考えられた。YSの初乳はIgA、IgG、IgM抗体価はそれぞれ2倍以下、中和活性は8倍であり、母親の罹患後もほとんど変動がなかった。また、SK、TMの母親でも中和活性は検出されたが、母乳中IgA抗体の反応は認めなかった (Fig. 3)。

RSV非感染例13例 (Fig. 4) の母乳においても、IgA

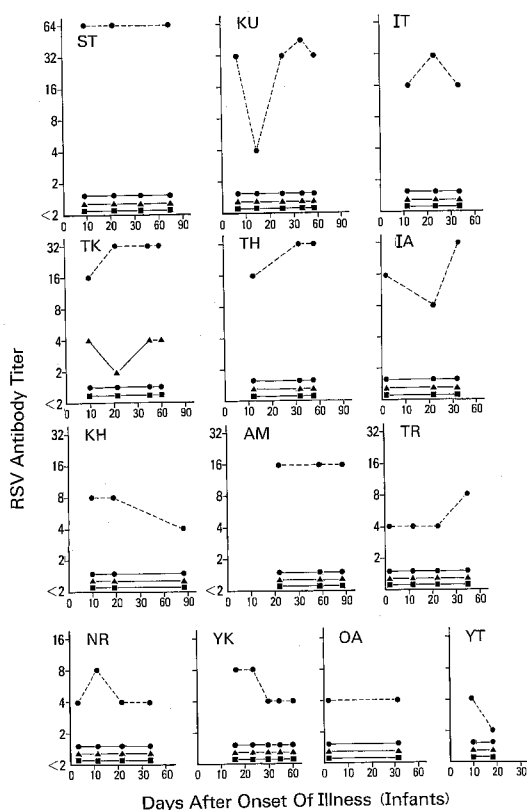


Fig. 4 Response of RSV antibody and neutralization activity in breast milk of mothers without RSV infection. Denotations are identical to those of Fig. 3.

抗体の反応は観察されなかったが、中和活性は全例において検出された。また、これら中和活性の推移に一定の傾向は認められなかった。IgG抗体が症例TKで検出されたが、むしろ、例外的反応と考えられた。なお、AMの母親の初乳はIgA、IgG、IgM抗体価は陰性、中和活性は32倍で、後者は児の罹患後の母乳中和活性 (1:16) とほぼ同じ値であった (Fig. 4)。

RSV感染の有無を検討できなかった6例のうち、1例でIgA抗体が2倍以下から4倍と低値ながら明らかに反応が認められ、この母親はRSVに罹患した可能性が考えられた。また、他の5例ではIgA抗体の反応はなかったが、同様に中和活性は全例で検出された (結果省略)。

4.3 母乳の抗ウイルス活性と児のRSV罹患との関係

母乳の抗RSV活性が乳児RSV感染に与える影響を知るため、罹患乳児が発症初期に摂取した母乳の抗RSV活性を対照群のそれと比較した。対照検体としてはRSV流行期の11月から4月迄に採取され、且つ、児に呼吸器感染の症状のない母親で得られた分娩後1~7カ月目の母乳49検体 (児の平均月齢; 3.0カ月) を選び、RSV罹患群で得られた最初の母乳24検体 (児の平均月齢; 5.4カ月) とIgA抗体価、中和活性を比較検討した (Fig. 5)。

中和活性、IgA抗体価とも児未罹患群が罹患群よりやや高く、中和活性の幾何平均は前者 $2^{4.2}$ 後者は $2^{3.5}$ であり、IgA抗体価では前者の幾何平均は $2^{0.34}$ 、後者では全例2倍以下であった。しかし、対照群との間にみられたこれらの差は、分娩後早期の母乳検体が対照群

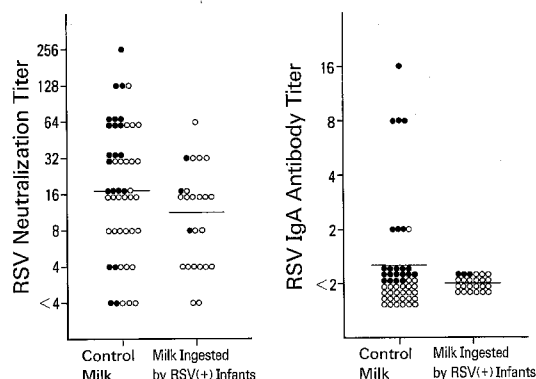


Fig. 5 Comparison of anti-RSV titers between control milk and milk ingested by infants with RSV infection in terms of neutralization activity and IgA antibody. Closed circles indicate specimens collected within a month postpartum.

において比較的多かったことによる可能性が考えられ、また、これら中和活性、IgA 抗体価について2群間の差に統計学的有意差はなく、RSV 罹患乳児の摂取する母乳の抗ウイルス活性が特に低いという証拠は得られなかった。

4・4 RIP による母乳 RSV IgA 抗体の解析

対象とした初乳5検体およびRSV 罹患母体2例(OA, STの母親)から経時的に採取された母乳5検体の概要をTable 2に示した。各検体を ^{35}S Methionine 標識(Fig. 6-8)、あるいは ^3H Glucosamine 標識(Fig. 9-11) RSV と反応させた後、protein A 処理のみでみられた沈降線を対照として、抗ヒトIgA 抗

Table 2 *Titers of RSV specific IgA, IgG and IgM antibody, and RSV neutralization titer of specimens employed for radioimmunoprecipitation*

Specimens	Time of collection	Titer of RSV antibody in class of			RSV neutralization titer
		IgA	IgG	IgM	
colostrum 4	3 days ^{a)}	64	<2	<2	64
colostrum 5	3 days	32	<2	<2	256
colostrum 10	3 days	256	<2	<2	2048
colostrum 11	2 days	<2	<2	<2	128
colostrum 12	3 days	<2	<2	<2	16
Milk (OA's mother)	2 days ^{b)}	<2	2	<2	<4
	18 days	32	2	<2	128
Milk (ST's mother)	1 days	<2	<2	<2	<4
	13 days	32	<2	<2	32
	34 days	2	<2	<2	4

a) days postpartum

b) days after onset of mother's RSV illness

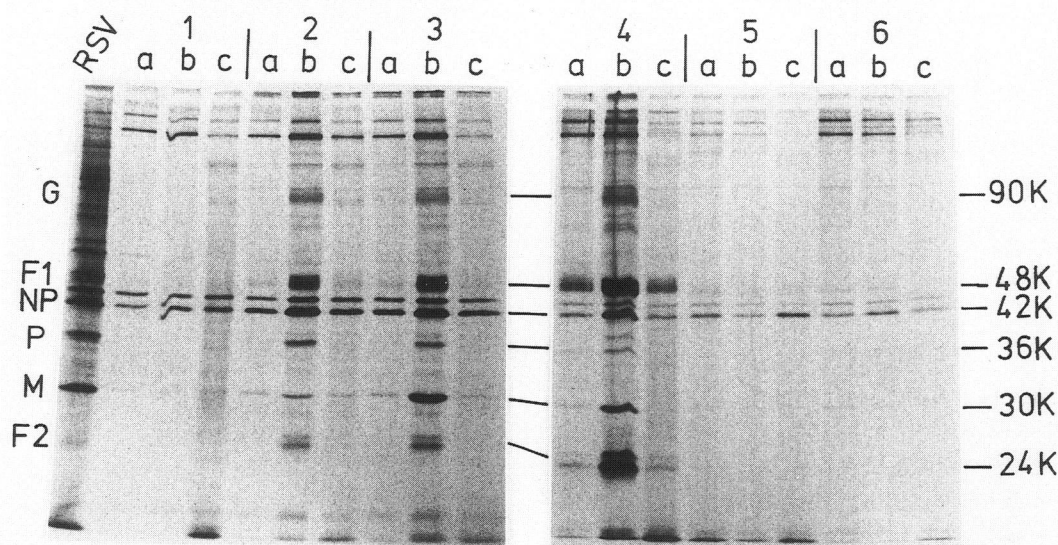


Fig. 6 ^{35}S methionine-labeled RSV polypeptides immunoprecipitated with colostrum. exp.1, no colostrum; exp.2, colostrum no.4; exp.3, colostrum no.5; exp.4, colostrum no.10; exp.5, colostrum no.11; exp.6, colostrum no.12. Lanes a were untreated, b and c were treated with anti-human IgA and with anti-human IgG respectively. The first lane was ^{35}S methionine-labeled RSV-infected cells. G, large glycoprotein (attachment protein); F, fusion protein; NP, nucleoprotein; P, phosphoprotein; M, matrix protein.

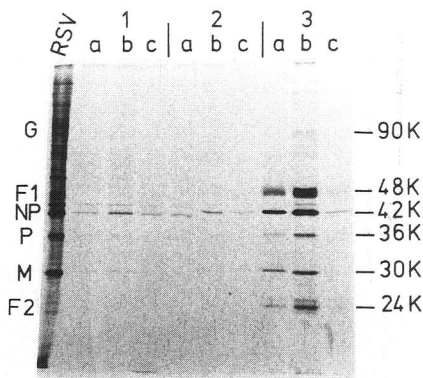


Fig. 7 [^{35}S] methionine-labeled RSV polypeptides immunoprecipitated with human milk obtained from a subject(OA) at acute(exp.2) and convalescent(exp.3) phases of RSV infection. In exp.1 no milk specimen was used. Other denotations are identical to those of Fig.6.

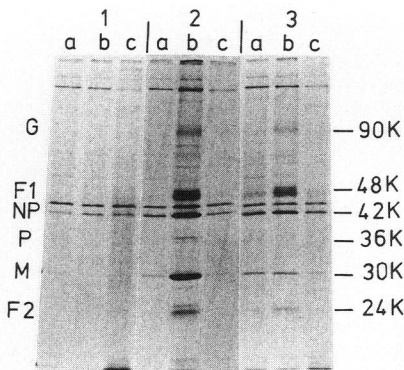


Fig. 8 [^{35}S] methionine-labeled RSV polypeptides immunoprecipitated with human milk obtained from a subject(ST) at acute(exp.1), early convalescent(exp.2) and late convalescent(exp.3) phases of RSV infection. Other denotations are identical to those of Fig.6.

体添加後 protein A 処理をおこなったもの、および抗ヒト IgG 抗体添加後 protein A 処理をおこなった場合の反応の変化を観察した。

初乳 IgA 抗体陽性検体(Fig. 6, 9; exp. 2, 3, 4)では、抗ヒト IgA で処理した場合にのみ、RSV 特異的蛋白沈降線の増強、出現が認められ、特に蛍光抗体法で IgA 抗体価 256 倍の初乳 (Fig. 6, 9; exp. 4) では最も強い反応がみられた。一方、これらとは対称的に、IgA 抗体陰性の 2 検体 (Fig. 6, 9; exp. 5, 6) では全く沈降線の増強は認められなかった。また、RSV 蛋白別にみると、 ^{35}S Methionine 標識による場合、fusion pro-

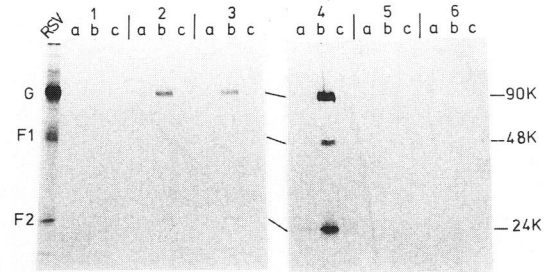


Fig. 9 [^3H] glucosamine-labeled RSV polypeptides immunoprecipitated with colostrum. Same specimens as in Fig.6 were employed in the identical order. All a, b and c lanes were treated as in Fig.6. The first lane was [^3H] glucosamine-labeled RSV-infected cell.

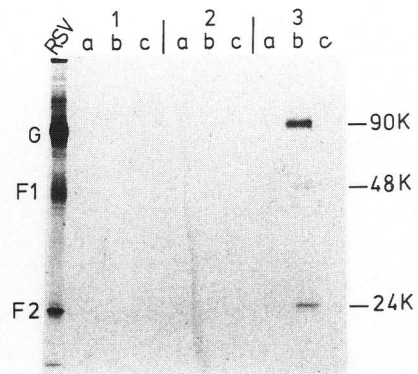


Fig. 10 [^3H] glucosamine-labeled RSV polypeptides immunoprecipitated with human milk. Same specimens as in Fig.7 (subject OA) were employed in the identical order. Other denotations are identical to Fig.9.

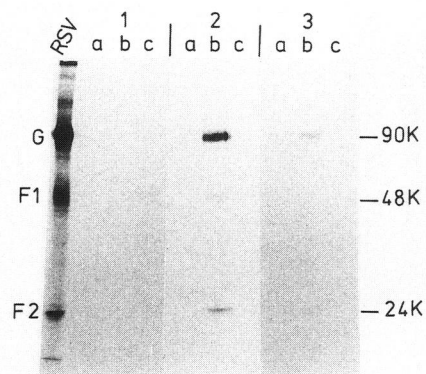


Fig. 11 [^3H] glucosamine-labeled RSV polypeptides immunoprecipitated with human milk. Same specimens as in Fig.8 (subject ST) were employed in the identical order. Other denotations are identical to Fig.9.

tein (48K, 24K), nucleoprotein (42K), phosphoprotein (36K), matrix protein (30K) など主な RSV 構成蛋白全てで反応の増強がみられたが、特に fusion protein に対する沈降線の増強が著しいように思われた (Fig. 6). また, [^3H] Glucosamine 標識による場合では large glycoprotein (attachment protein) に対する沈降線の増強が明らかであり (Fig. 9), さらに、一検体では fusion protein に対する反応の増強も認められた。これら抗 fusion protein 抗体、抗 large glycoprotein 抗体は中和活性と密接な関係を有する^{13,14)}ことが知られており、初乳 IgA 抗体陽性検体では中和活性のかなりの部分がこのような IgA 抗体による可能性が示唆された。なお、これら初乳検体において RSV IgG 抗体は検出されていないが、これに一致して、抗 IgG 抗体による沈降線の増強は認められなかった。

RSV 罹患母体 2 例 OA (Fig. 7, 10), ST (Fig. 8, 11) から得られた母乳検体でも、抗 IgA 抗体によってのみ沈降線の増強がみられた。即ち、急性期では沈降線の増強を欠くが、回復期において [^{35}S] Methionine, [^3H] Glucosamine 標識ともに抗 IgA 抗体による各蛋白成分の増強が著明であり、また、その程度は蛍光抗体法による RSV IgA 抗体価の変動を良く反映していると考えられた。同様に RSV IgG 抗体価が陰性あるいはごく低値 (2 倍) であることに一致して、抗 IgG 抗体による増強はみられなかった。

5 考 察

新生児、乳児における母乳栄養の重要性は栄養学的な面のみならず、この時期、乳児が経験する数多くの感染性疾患に対して抵抗性を賦与していると考えられる点にあり、これを示唆する多くの臨床的、あるいは疫学的観察がある¹⁵⁻¹⁷⁾。母乳栄養と RSV 感染の関係は Downham *et al.*⁷⁾ により初めて指摘された。即ち、彼らは RSV 感染で入院を要した乳児の母乳摂取率 (7%) が対照群のそれ (28%) に比し、明らかに低いことを報告した。次いで、Glezen and Denny⁸⁾ も医療機関別に RSV 罹患と母乳摂取の関係について調べ、公的病院で入院を要した肺炎、細気管支炎症例のほとんどが人工栄養児であることを見出だしている。また、同様の報告は Pullan *et al.*⁹⁾ によってもなされている。本邦では当教室の三戸¹⁸⁾ が RSV 感染児 76 名について栄養方法を調べ、対照とした正常乳児 (142 名) の母乳摂取率 54.9% に比し、RSV 感染児では摂取率がわずかに 21.1% と有意に差のあることを明らかにしている。しかし、これらの成績は、治療を必要として医療機関を

受診した者についての cross sectional な検討である。

一方、新生児期から母乳栄養児、人工栄養児を prospective に 4 年間観察した成績が Frank *et al.*¹⁹⁾ により報告されている。それによると両群の間に RSV を含めて呼吸器ウイルス感染の頻度に差はないが、生後 6 カ月迄の間、母乳栄養児群において肺炎、細気管支炎など重症下気道感染の頻度が有意に低値であったという。従って、これらの観察結果から、母乳栄養の基本的な役割は感染阻止ではなく、疾患重症化の阻止にあるとする考え方が一般的である。

母乳中には IgA 抗体をはじめとする抗 RSV 活性が存在し、特に初乳ではその活性が高い。Toms *et al.*¹⁰⁾ は膜蛍光抗体法により、RSV 流行終了後に採取された初乳 16 検体中 11 検体 (69%) に RSV IgA 抗体を検出し、また、Fishaut *et al.*¹¹⁾ も同様の方法により、年間を通じて得られた 24 の初乳検体では 18 例 (75%) が IgA 抗体陽性であり、RSV IgG 抗体は 7 例 (29%)、RSV IgM 抗体は 1 例 (4%) が陽性であったことを報告している。また、これらの報告に共通して、初乳期以後、IgA 抗体の検出率は低下し、分娩後 1~3 カ月の IgA 抗体の検出率は 20% (Toms *et al.*¹⁰⁾) ないし 40% (Fishaut *et al.*¹¹⁾) に低下している。今回の著者らの検索では、初乳期以後で抗体価、検出率とも急速に低下する点はそれらと一致した所見であったが、初乳 IgA 抗体の検出率はこれらの成績とは多少異なり、平均 7% と低値を示した。著者らの抗体検出率がこのように比較的低値であった理由として、用いた抗原の状態あるいは抗体価判定の違いなどが考えられる。例えば判定方法について、Toms *et al.*¹⁰⁾ は、McIntosh *et al.*²⁰⁾ の方法に基づき、膜蛍光の強さにより 1+ から 4+ までに分類し、1+ を示す検体の最高希釈倍数をその抗体価としているが、このような場合、終末価判定において客観性の損なわれる可能性がある。これらのことから、著者は感染細胞 50% 陽性を終末価としたが、この場合、多少検出感度の低下をきたす可能性は否定できないと考えられた。

今回の検索で、初乳 RSV IgA 抗体陽性率に季節差のみられたことは母乳抗体産生機序を考える上で興味ある所見と思われる。即ち、初乳中 RSV IgA 抗体は 5 月~6 月の非流行期において明らかに検出頻度、抗体価とも高値であった。母体が RSV に暴露される機会は本症流行のピーク、1~2 月に最も多いと考えられ、この場合 IgA 抗体の出現迄数カ月要することになる。このことは RSV 感作 IgA 産生細胞の乳腺組織への選択的移行、あるいは RSV IgA 抗体の同組織における濃縮に

一定期間が必要なことを意味するのかも知れない。しかし、今回の RSV 罹患母体についての検討では、2 例において RSV 罹患後 2 週頃より母乳中に IgA 抗体が出現しており、このような考え方のみでは初乳 IgA 抗体の季節的変動を充分説明しえないかも知れない。一方、このような初乳 RSV IgA 抗体の季節的差は Nandapalan *et al.*²¹⁾ も報告しており、その理由として、妊娠末期における母体の免疫能低下状態が、RSV 感染に対する免疫反応をも抑制している可能性を指摘した。たしかに RSV 感染は冬期に流行し、また、この時期母親もしばしば再感染し得ることを考えると一つの可能性として考慮されるべき問題かも知れない。いずれにせよ、これらは母体の気道局所における RSV 感染と母乳中 RSV IgA 抗体反応の密接な関係を意味し、さらに、何らかの調節機構の存在をも示唆しているかも知れない。

初乳あるいは RSV 罹患母体の乳汁についての免疫沈降法による分析では、この IgA 抗体は fusion protein, large glycoprotein (attachment protein) を含め、中和抗体を誘導するエンベロープ蛋白に対して特異性のあることが明らかとなった。このことは、IgA 抗体価の高い母乳検体が中和抗体価も比較的高値であることとも一致し、母乳栄養児の RSV 感染に際してはその侵入局所における一つの増殖抑制機構となり得る可能性を示唆している。実際、出生後数カ月の乳児の RSV 感染では局所 IgA 抗体の産生がそれ以後の時期に比較し著明に弱いことが McIntosh *et al.*²²⁾ Kaul *et al.*²³⁾ により指摘されており、母乳中 IgA 抗体はこれら乳児の局所免疫機構を補強する点にその意義があるのかも知れない。

一方、初乳 IgA 抗体の季節的変動、初乳期以後におけるその比較的急速な低下、さらに、RSV 罹患母体の母乳 IgA 抗体反応の頻度が必ずしも高率でない点などを考えると、局所での感染抑制において、非特異的の中和物質も無視しえない役割を有すると推測される。即ち、RSV 中和活性は、初乳の場合 IgA 抗体の有無にかかわらず全例陽性であり、分娩後 7 カ月迄の乳汁においても大部分の検体で検出された。また、RSV 罹患母体からの乳汁でも特異抗体の有無にかかわらず比較的高い活性の存在が判明した。このような免疫グロブリンによらない中和活性の存在は Toms *et al.*¹⁰⁾ も報告しており、また、Laegreid *et al.*²⁴⁾ は、母乳上清の 50% 硫酸アンモニウム沈澱、ゲル濾過により分子量 400,000 以上の蛋白を得、さらにアフィニティ・クロマトグラフィーにより IgA 抗体を除去しても依然として

中和活性が存在したことを報告している。今回の検討では、この非特異的中和活性についての詳しい分析はおこなわなかったが、以上の報告からも免疫グロブリン以外の物質が、これら中和活性の主体をなし、また、RSV 感染に対して抵抗性を賦与している可能性が示唆された。

以上、母乳栄養が乳児 RSV 感染の一防御機序となりうる可能性について述べたが、本症の免疫機構との関連で考えるとさらに検討すべき問題が存在する。即ち、母乳栄養の効果は以上の知見に基いて考えた場合、その作用部位は上気道にあると推定されるが、前述した Frank *et al.*¹⁹⁾ の臨床的観察によれば、その本質的役割は下気道疾患の軽症化にあるとされている。たしかに上気道でのウイルス増殖に与える影響は下気道への RSV 侵襲に対して抑制的に働く可能性があるかも知れない。しかし、現在のところこれらの点についてヒトで明かな説明はなされていない。

RSV 下気道感染における免疫反応の役割については動物実験でいくつか検討がなされている。即ち、Prince *et al.*²⁵⁾ は cotton ラットの RSV 経鼻感染において、局所における免疫が消失しても血中 RSV 抗体が持続する間は肺内におけるウイルス増殖は完全に抑制されること、また、受動的に投与された特異抗体は局所 RSV 増殖には影響を与えないが、肺内 RSV 増殖を完全に抑制しうることを明らかにした。また、最近では中和活性を有する RSV 単クローン性抗体（エンベロープ抗体）の受動的投与でも同様な効果の得られることが報告されている²⁶⁾。ヒトにおいてはこのような明瞭な成績はなく、わずかに血清中和抗体価が下気道疾患、特に RSV 肺炎の重症度と逆比例したとする報告²⁷⁾ がある程度である。しかし、全体としてこれらの観察は、RSV 下気道感染に対する抵抗性が血清抗体とより密接な関係にあることを示唆しており、母乳免疫グロブリンが消化管を介して新生児に移行するマウスあるいは cotton ラットとは異なり、ヒトでこのような面から母乳の役割を評価することは困難である。

乳児 RSV 感染に対する母乳栄養の意義は、現時点では、以上述べた如く未だ発達不十分な局所免疫機構の補強にあると考えられる。しかし、近年、母乳には児の特異的、非特異的免疫能を修飾する働きがある可能性も推測されており²⁸⁻³⁰⁾、これを介する系統的免疫機構への影響も注目すべき問題と思われる。例えば、Mito *et al.*³¹⁾ は、RSV 感染乳児のウイルス特異的リンパ球幼若化反応は母乳栄養児において低いことを見出し、母乳栄養児では遅延型過敏反応が抑制されている可能

性を指摘した。事実、非特異的 mitogen に対するリンパ球の反応も母乳栄養児において低いことがその後報告されている³²⁾。また、Chiba *et al.*³³⁾ は、RSV 感染児の血清 α -インターフェロンは母乳栄養児で有意に高値であることを明らかにした。 α -インターフェロンは抗ウイルス作用のみならず、遅延型過敏反応の抑制作用があり、逆に、ウイルス特異的、非特異的細胞障害性リンパ球に対しては活性増強的に働く³⁴⁻³⁶⁾ ことも知られている。従って、これら母乳栄養が系統的免疫機構に与える影響は局所でのウイルス増殖抑制効果とともに、RSV 感染の臨床像を規定する重要な因子である可能性が推測され、今後このような面からの検討も母乳栄養の役割を明らかにするため必要と思われる。

6 要 約

乳児 RSV 感染の防御機構に母乳栄養が果たす役割を検討するため、初乳、それ以後の時期における乳汁中のクラス別 RSV 特異抗体および中和活性につき調べた。初乳中 RSV IgA 抗体は 547 検体中 40 検体 (7%) に検出され、頻度は 5 月、6 月 (15%) で最も高率であった。しかし、初乳期以後、大部分の IgA 抗体価は急速に低下する傾向にあった。一方中和活性は全ての初乳、また、大部分の乳汁中に検出され比較的高い値が維持された。RSV 罹患児の母親のうち 5 名の母親で RSV 感染がみられ、そのうち 2 例で母乳中に RSV IgA 抗体の反応がみられた。IgA 抗体陽性の初乳、乳汁の免疫沈降法による分析ではこの IgA 抗体は fusion protein, attachment G protein を含めて主な RSV 構造蛋白に対して特異性を有することが明らかとなった。以上の成績から母乳栄養は RSV IgA 抗体および非特異的中和物質が乳児の未熟な局所免疫機構を補強することによりその効果を発揮していることが示唆された。

稿を終えるにあたり、実験遂行、論文の作成に際し種々の御教示をいただきました国立病院医療センターの千葉靖男博士に深く感謝の意を表します。また、免疫沈降法に関して御指導いただいた当教室の堤裕幸博士、ならびに、今回の実験に御協力いただきました当教室の諸先生、札幌第一病院看護室に感謝いたします。

文 献

- Chanock, R. M., Kim, H. W., Vargosko, A. J., Deleava, A., Johnson, K. M., Cumming, C. and Parrott, R. H.: Respiratory syncytial virus. I. Virus recovery and other observations during 1960 outbreak of bronchiolitis, pneumonia and minor respiratory diseases in children. **JAMA** **176**, 647-653 (1961).
- Parrott, R. H., Vargosko, A. J., Kim, H. W., Cumming, C., Turner, H., Huebner, R. J. and Chanock, R. M.: Respiratory syncytial virus. II. Serologic studies over a 34-month period of children with bronchiolitis, pneumonia and minor respiratory disease. **JAMA** **176**, 653-657 (1961).
- McDonald, N. E., Hall, C. B., Suffin, S. C., Alexon, C., Harris, P. J. and Manning, J. A.: Respiratory syncytial virus infection in infants with congenital heart disease. **N. Engl. J. Med.** **307**, 397-400 (1982).
- 津田哲哉, 沢田陽子, 池田和男, 藤林伸助, 三戸和昭, 千葉靖男, 松浦晃洋: 肺高血圧を合併した左一右短絡型先天性心疾患の respiratory syncytial virus 感染. **日児誌** **86**, 2076-2082 (1982).
- Belshe, R. B., Voris, L. P. V. and Mufson, M. A.: Parenteral administration of live respiratory syncytial virus vaccine.: Result of a field trial. **J. Infect. Dis.** **145**, 311-319 (1982).
- Wright, P. F., Belshe, R. B., Kim, H. W., Voris, L. P. V. and Chanock, R. M.: Administration of a highly attenuated, live respiratory syncytial virus vaccine to adults and children. **Infect. Immun.** **37**, 397-400 (1982).
- Downham, M. A. P. S., Scott, R., Sims, D. G., Webb, J. K. G. and Gardner, P. S.: Breast-feeding protects against respiratory syncytial virus infections. **Br. Med. J.** **2**, 274-276 (1976).
- Glezen, W. P. and Denny, F. W.: Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. **N. Engl. J. Med.** **288**, 498-505 (1973).
- Pullan, C. R., Toms, G. L., Martin, A. J., Gardner, P. S., Webb, J. K. G. and Appleton, D. R.: Breast-feeding and respiratory syncytial virus infection. **Br. Med. J.** **281**, 1034-1036 (1980).
- Toms, G. L., Gardner, P. S., Pullan, C. R., Scott, M. and Taylor, C.: Secretion of respiratory syncytial virus inhibitors and antibody in human milk throughout lactation. **J. Med. Virol.** **5**, 351-360 (1980).
- Fishaut, M., Murphy, D., Neifert, M., McIntosh, K. and Ogra, P. L.: Bronchomammary axis in the immune response to respiratory syncytial virus. **J. Pediatr.** **99**, 186-191 (1981).
- Zaia, J. A. and Oxman, M. N.: Antibody to varicella-zoster virus-induced membrane antigen.: Immunofluorescence assay using monodisperse glutaraldehyde-fixed target cells. **J. Infect. Dis.**

- 136, 519-530 (1977).
13. Walsh, E. E. and Hruska, J.: Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: Identification of the fusion protein. *J. Virol.* **47**, 171-177 (1983).
 14. Taylor, G., Stott, E. J., Bew, M., Fernie, B. F., Cote, P. J., Cote, P. J., Collios, A. P., Hughes, M. and Jebbett, J.: Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology* **52**, 137-142 (1984).
 15. Chandra, R. K.: Prospective studies of the effect of breast feeding on incidence of infection and allergy. *Acta Paediatr. Scand.* **68**, 691-694 (1979).
 16. Cunningham, A. S.: Morbidity in breast-fed and artificially fed infants. II. *J. Pediatr.* **95**, 685-689 (1979).
 17. Taylor, B., Golding, J. and Wadsworth, J.: Breast-feeding, bronchitis and admissions for lower-respiratory illness and gastroenteritis during the first five years. *Lancet* **1**, 1227-1229 (1982).
 18. 三戸和昭: 乳児 respiratory syncytial virus 感染症の臨床的および免疫学的研究. *札幌医誌* **53**, 689-704 (1984).
 19. Frank, A. L., Taber, L. H., Glezen, W. P., Kasel, G. L., Wells, C. R. and Paredes, A.: Breast-feeding and respiratory virus infection. *Pediatrics* **70**, 239-245 (1982).
 20. McIntoch, K., McQuillin, J. and Gardner, P. S.: Cell-free and cell-bound antibody in nasal secretions from infants with respiratory syncytial virus infection. *Infect. Immun.* **23**, 276-281 (1979).
 21. Nandapalan, N., Taylor, C. E., Greenwell, J., Scott, M., Scott, R., Hey, E. N. and Toms, G. L.: Seasonal variations in maternal serum and mammary immunity to RS virus. *J. Med. Virol.* **20**, 79-87 (1986).
 22. McIntoch, K., Masters, H. B., Orr, I., Chao, R. K. and Barkin, R. M.: The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. *J. Infect. Dis.* **138**, 24-32 (1978).
 23. Kaul, T. N., Welliver, R. C., Wong, D. I., Udawadia, R. A., Riddlesberger, K. and Ogra, P. L.: Secretory antibody response to respiratory syncytial virus infection. *Am. J. Dis. Child.* **135**, 1013-1016 (1981).
 24. Laegreid, A., Kolstø Otnaess, A. B., Orstavik, I. and Carlsen, K. H.: Neutralizing activity in human milk fractions against respiratory syncytial virus. *Acta Paediatr. Scand.* **75**, 696-701 (1986).
 25. Prince, G. A., Horswood, R. L., Camargo, E., Koenig, D. and Chanock, R. M.: Mechanisms of immunity to respiratory syncytial virus in cotton rats. *Infect. Immun.* **42**, 81-87 (1983).
 26. Walsh, E. E., Schlesinger, J. J. and Brandriss, M. W.: Protection from respiratory syncytial virus infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **43**, 765-758 (1984).
 27. Lamprecht, C. L., Krause, H. E. and Mufson, M. A.: Role of maternal antibody in pneumonia and bronchiolitis due to respiratory syncytial virus. *J. Infect. Immun.* **134**, 211-216 (1976).
 28. Ogra, S. S. and Ogra, P. L.: Immunologic aspects of human colostrum and milk. II. Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different times after the onset of lactation. *J. Pediatr.* **92**, 550-555 (1978).
 29. Scott, R., Scott, M. and Toms, G. L.: Cellular and antibody response to respiratory syncytial (RS) virus in human colostrum, maternal blood, and cord blood. *J. Med. Virol.* **8**, 55-66 (1981).
 30. Goldman, A. S., Thorpe, L. M., Goldblum, R. M. and Hanson, L. A.: Anti-inflammatory properties of human milk. *Acta Paediatr. Scand.* **75**, 689-695 (1986).
 31. Mito, K., Chiba, Y., Suga, K. and Nakao, T.: Cellular immune response to infection with respiratory syncytial virus and influence of breast-feeding on the response. *J. Med. Virol.* **14**, 323-332 (1984).
 32. Stephens, S., Brenner, M. K., Duffy, S. M., Lakhani, P. K., Kennedy, C. R. and Farrant, J.: The effect of breast-feeding on proliferation by infant lymphocytes in vitro. *Pediatr. Res.* **20**, 227-231 (1986).
 33. Chiba, Y., Minagawa, I., Mito, K., Nakane, A., Suga, K., Honjo, T. and Nakao, T.: Effect of breast feeding on responses of systemic interferon and virus-specific lymphocyte transformation in infants with respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Virol.* **21**, 7-14 (1987).
 34. Blomgren, H., Strander, H. and Cantell, K.: Effect of human leukocyte interferon on the response of lymphocytes to mitogenic stimuli in vitro. *Scand. J. Immunol.* **3**, 697-705 (1974).
 35. Heron, I., Berg, K. and Cantell, K.: Regulatory effect of interferon on T cells in vitro. *J. Immunol.* **117**, 1370-1373 (1976).

36. Herberman, R. R., Ortaldo, J. R. and Bonnard, G. D.: Augmentation by interferon of human natural and antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity. **Nature** 277, 221-223 (1979).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 本庄高司